# طريقة مبسطة لتنقية لكتين جنين الحنطة بكروموتوكرافيا الألفة

إيناس مظفر العبادي[1] محمد عمر محي الدين[2] علي عبد الرحمن طه[3]

1، 2 قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد – بغداد – العراق

3 مركز بحوث التقانات الاحيائية – جامعة النهرين– الجادرية– بغداد – العراق

**المستخلص**

نظرا للاستخدامات المتعددة للكتين النقي فقد هدفت هذه الدراسة إلى استخلاصه من جنين الحنطة ، وهو أحد النواتج العرضية لتصنيع الطحين .وشملت خطوات الاستخلاص إزالة الدهن من جنين الحنطة باستخدام الهبتان تلاه استخلاص اللكتين بمحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار بنسبة (10:1) (وزن/حجم) مدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 25 م. واخضع المستخلص الخام لخطوات تنقية عدة تمثلت بتركيزه بالترشيح الفائق لإزالة نسبة كبيرة من المركبات ذات الأوزان الجزيئية التي تقل عن 10000 دالتون. وأجريت عملية غسل وترشيح متكررة Diafiltration للانموذج المركز باستخدام محلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي الأس الهيدروجيني 8.5 وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية للكتين بلغت 5.71 مرة وبحصيلة مقدارها 98.34 % . تلتها خطوة كروماتوكرافيا التبادل الأيوني بأسلوب الوجبة باستخدام المبادل ثنائي اثيل امينو اثيل سيليلوز DEAE-Cellulose وبلغت عدد مرات التنقية لجزء الغسل 7.5 مرة في حين بلغت حصيلة اللكتين 80 %. و أخيرا جرت خطوة تنقية اللكتين باستخدام كروماتوكرافيا الألفة بعمود الكايتين والذي حضر مختبريا من الهيكل الخارجي للروبيان وأسفرت عملية التحضير عن الحصول على ما يقارب من 40 غم كايتين أي ما يعادل 20 % كايتين من وزن القشور الجافة واستخدم الكايتين المحضر بوصفه شبكة للفصل وذراعا في كروماتوكرافيا الألفة لتنقية اللكتين. وبلغت عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوة 20 مرة وبحصيلة مقدارها 19.51 %. وقد تبين ان اللكتين المنقى يتميز بنقاوة عالية حد التجانس وذلك بظهوره حزمة واحدة عند ترحيله كهربائيا في هلام متعدد الاكريلامايد بظروف ماسخة بوجود المادة المختزلة 2-ميركابتوايثانول وغيابها. وباتباع الخطوات المذكورة في هذه الدراسة بلغت كمية اللكتين المحصل عليها 60 ملغم/ 1000 غم من جنين الحنطة .



# SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF WHEAT GERM LECTIN BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Inas M. Al-Aubadi[1] Mohamed O. Muhyaddin[2] Ali A.Taha[3]

1 , 2 Depart.of Food Sci. &Biotechnology, College of Agriculture, Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq.

3 Biotechnology Reserch Center, Al-Nahrain Univ.

**ABSTRACT**

Because of various application of purified lectin ,the aim of this study was to extract it from wheat germ which is one of the byproducts from wheat processing . The extraction steps including fat elimination from wheat germ by heptan fellowed by lectin extraction by 0.05 M hydrochloric acid solution in ratio (1:10)(w/v) for one hour at 25C . The crud extract was subjected to different purification steps including concentration by ultrafiltration by this step it was possible to eliminate high portion of low molecular wight compounds which is below 10000 dalton.The difiltration was done to concentrated the sample by 0.01 M Tris-HCL, pH 8.5 .The purification folds and yeild of the lectin were 5.71 and 98.34% respectively. Ion-exchange chromatography by bachwise procedure using Diethel amino ethel cellulose (DEAE-Cellulose) then affinity chromatography by chitin column, where the chitin itself was prepared from outer shells of shrimp ,we obtained about 40 g chitin which is equel to 20% chitin from the dry shells then the chitin was used as a matrix and a ligand in affinity chromatography for purification of the lectin after this step the purification fold was 20 and yeild of the lectin was 19.51 % . The lectin was purified to homogeneity as indicated by presence of one band in polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions in presence and absence of the reducing

agent 2- mercaptoethanol. The amount of lectin is about 60 mg/1000 gm of wheat germ when using the steps which indecated in this study.

- بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

## المقدمة

اكتشفت اللكتينات لأول مرة عام 1889 من لدن الباحث Stillmark في جامعة Dorpat في استونيا عندما لاحظ ان مستخلصات بذور الخروع Castor bean (*Ricinus communuis*) تمتلك قدرة على ملازنة كريات الدم الحمر ثم قام بعزل المادة المسؤولة عن التلازن ونقاها جزئيا وسماها بالرايسين Ricin، مسجلا بذلك أول دراسة حول الملازنات النباتية. وبعد مدة وجيزة اكتشف Helfin من الجامعة نفسها ان المستخلص السام لبذور نبات Jequirity bean (*Abrus precatorius*) يمتلك قدرة مماثلة على ملازنة الخلايا وسمي الملازن الجديد بـ Abrin(6 ، 26). وتعد اللكتينات النباتية مجموعة غير متجانسة من البروتينات أو البروتينات السكرية التي تشترك بقدرتها على الارتباط بوحدات سكرية محددة فضلا عن ملازنة الخلايا . ونظرا لوجود اللكتينات في أنواع عديدة من النباتات وضمن أنسجة مختلفة لذلك يعتقد انها تؤدي أدوار بايولوجية مهمة (19) وقد عرفت اللكتينات بانها بروتينات أو بروتينات سكرية ذات طبيعة تختلف عن الأجسام المضادة والانزيمات كونها ترتبط ارتباطا متخصصا وعكسيا بالكاربوهيدرات مما يسبب تلازن الخلايا أو ترسيب السكريات المتعددة والمقترنات السكرية Glycoconjugates (27).تزايد عدد اللكتينات المكتشفة بشكل ملحوظ، إذ اكتشفت المئات منها من مصادر مختلفة وفي مقدمتها بذور النباتات ( 3 ،11) فضلا عن الحيوانات (4 ،5 ، 14) والأحياء المجهرية (2، 23 ،28).استحوذت اللكتينات على اهتمام الباحثين ، عندما ذكر Aub وزملاؤه عام 1963 لأول مرة وجود مادة في المستحضر التجاري للايبيز جنين الحنطة لها القدرة على ملازنة الخلايا الخبيثة Malignant cells خلافا للخلايا الطبيعية وبعد مرور بضع سنوات سميت المادة المسببة للفعالية التلازنية لجنين الحنطة بملازن جنين الحنطة Wheat germ agglutinin (WGA) ويتميز هذا اللكتين بقدرته على الارتباط وبشكل متخصص بـ N-acetylglucosamine و N-acetylnuraminic acid (25) وازداد الاهتمام بهذا اللكتين مع اكتشاف ان هذا البروتين يؤدي أدوارا مهمة في نبات الحنطة.وبسبب الأهمية المتزايدة للكتين في التطبيقات التشخيصية ولارتفاع ثمن المستورد منه، إذ يعد WGA أحد اللكتينات الباهضة الثمن ، ونظرا لافتقار البلد إلى مثل هذا النوع من الدراسات وللحاجة الماسة إلى مثل هذه التطبيقات وخصوصا فيما يتعلق بالإفادة من نواتج تصنيع الحنطة بوصفها مادة خام يمكن الإفادة منها في هذا المجال الحيوي، فقد وقع الاختيار على مخلفات المطاحن من جنين الحنطة الذي يعزل في بعض مطاحن القطر بشكل اكثر نقاوة عن النخالة، بهدف تنقية اللكتين منه لاعتماده أداة مهمة في حقل البحوث الحيوية عن طريق استخدامه وسيلة تشخيصية في الكيمياء الحياتية وفي مجالات المناعة وعلم الأحياء المجهرية والمجالات الأخرى ذات الصلة.

## المواد وطرائق العمل

1- **تهيئة مسحوق جنين الحنطة :** تم الحصول على جنين الحنطة من الشركة العامة لتصنيع الحبوب / مطحنة الدورة و استخدم بوصفه مصدرا للكتين . جرى طحن الجنين وغربلته في طاحونة كهربائية مختبرية للحصول على مسحوق ناعم وحفظ في أكياس بولي اثيلين جافة ونظيفة ومحكمة الإغلاق بدرجة حرارة – 18 م لحين الاستخدام.

2- **تحضير المستخلص الخام للكتين جنين الحنطة :**حضر المستخلص الحامضي الخام وفقا للطريقة التي ذكرها Zeng وRuckenstein (29) إذ جرى إزالة الدهن من 500 غم من جنين الحنطة المطحون مرتين بمزجه مع

3000 مل من الهبتان لمدة ساعتين بدرجة حرارة 25 م ، ترك ليركد مدة 15 دقيقة ثم رشح عبر قماش من القطن تبعه الترشيح تحت التفريغ عبر ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 وجفف هوائيا لليوم التالي للتخلص من بقايا الهبتان. وتم استخلاص اللكتين بتعلق جنين الحنطة مزال الدهن بمحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار بنسبة (10:1) (وزن/حجم) ومزج بمحرك مغناطيسي مدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 25 م ثم ترك ليركد لمدة 15 دقيقة قبل ترشيحه عبر قماش من القطن ونبذ الراشح مركزيا بسرعة 10000 × g مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 م.

**3- تقدير فعالية اللكتين** : قدرت فعالية اللكتين بطريقة التلازن الدموي Hemagglutination assay وفق طريقة Zeng وRuckenstein (29) باجراء التخفيف المتسلسل Serial dilution لـ 50 مايكرولتر من الأنموذج مع حجم مساو من محلول الملح الفسلجي Phosphate buffer saline ( PBS) (حضر من فوسفات الصوديوم بتركيز 0.01 مولار الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.15 مولار بأس هيدروجيني 6.8) في أطباق المعيار الدقيق Microtiter plates ذات قاعدة بشكل حرف U . أضيف 50 مايكرولتر من عالق كريات الدم الحمر البشرية من فصيلة $A^+$ لكل حفرة ،مزج الطبق جيدا وقيم التلازن الدموي بعد مرور ساعة واحدة من وضع الأطباق بدرجة حرارة 25 م. وعبر عن الفعالية التلازنية بـ (وحدة /مل) واحتسبت الفعالية من مقلوب أخر تخفيف حدث فيه التلازن مقسوما على الحجم الكلي للمستخلص المستخدم في الاختبار.

**4- تقدير تركيز البروتين:** اتبعت طريقة Bradford (8) لتقدير تركيز البروتين في النماذج واحتسب تركيز البروتين بالاستعانة بالمنحنى القياسي لألبومين المصل البقري .

**5- تنقية اللكتين :**

**أ- تركيز اللكتين :** أجريت عملية الترشيح الفائق للمستخلص الخام في خلية الترشيح الفائق باستخدام المرشح الغشائي peillicon® membran millipore disc (PT Series) الذي يمنع مرور المركبات ذات الأوزان الجزيئية التي تزيد عن 10000 دالتون في خلية الترشيح تحت ضغط غاز النتروجين مقداره 50 باوند/انج$^2$ بدرجة حرارة 4 م . وجرت عملية الغسل والترشيح المتكرر Diafiltration للأنموذج المركز باستخدام محلول Tris - HCl الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي الأس الهيدروجيني 8.5. قيس بعدها حجم المركز وقدرت فعاليته التلازنية وتركيز البروتين فيه.

**ب- التنقية بعمود كروماتوكرا فيا التبادل الايوني :** ضبط الأس الهيدروجيني للمحلول المركز من خطوة الترشيح الفائق إلى أس هيدروجيني 8.5 باضافة بلورات الترس Tris ومزج مع 400 مل من المبادل الايوني الرطب DEAE- Cellulose الموازن بمحلول Tris- HCl الدارئ بتركيز0.01 مولار باس هيدوجيني 8.5 في بيكر وبعد مرور ساعة رشح تحت تفريغ على ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 في قمع بخنر وغسل المبادل بمحلول Tris- HCl الدارئ وجمعت الاجزاء الحاوية على فعالية تلازنية ، بعدها قيس الحجم وقدرت الفعالية التلازنية وتركيز البروتين بالأسلوب السابق ذكره.

**ج – تحضير الكايتين مختبريا:** اتبعت طريقة الجلاخ (1) في تحضير الكايتين من الروبيان Shrimp الذي تم الحصول عليه من محافظة البصرة واستخدمت مخلفاته غير الصالحة للأكل (الهيكل الخارجي) مصدرا طبيعيا للحصول على الكايتين.

**د- كروماتوكرافيا الألفة Affinity chromatography**

اخضع الكايتين المحضر مختبريا لمعاملات أولية قبل استخدامه في عمود الألفة إذ طحن في طاحونة كهربائية لبضع دقائق وغسل تحت التفريغ في قمع بخنر لمرات عدة بالماء المقطر ومن ثم غسل بحامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 عياري تلاه الغسل بكاربونات الصوديوم بتركيز 1% وأخيرا غسل بالكحول الاثيلي بتركيز 98% بحيث بلغت قيمة الامتصاصية لمحلول الغسل اقل من 0.05 عند طول موجي 280 نانومتر. ثم عبئ في عمود بأبعاد ( 48 × 2.5 سم) وجرى موازنة عمود الألفة

بمحلول Tris- HCl الدارئ بتركيز 0.01 مـولار ذي أس هيدروجيني 8.5 ثم مرر محلول اللكتين من خطـوة التبادل الايوني في عمود الكايتين بسرعة جريان 2 مل / دقيقة ،غسل بمحلـول Tris- HCl الدارئ تبعه إجراء الغسل بمحلول Tris - HCl الدارئ الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 1 مـولار ذي اس هيـدروجيني8.5 ومن ثم غسل العمـود بمحلـول Tris- HCl الـدارئ. وجرى إزاحة اللكتين باستخدام محلـول حـامض HCl **بتركيز 0.05 مولار، وتمت عمليتا الغسل والاسـترداد** بسرعة جريان 300 مل/ساعة بواقع 10 مـل/جـزء ، قيست الامتصاصية للأجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانومتر وجمعت الأجزاء الحاوية علـى الفعاليـة التلازنية.

**6- الترحيل الكهربائي في هـلام متعـدد الاكريلامايـد بوجود المواد الماسخة** استخدمت هذه الطريقة لاختبـار نقاوة اللكتين المنقى وحضرت المحاليل وأجريت عمليـة الترحيل الكهربائي تبعا للطريقة الموصوفة من قبل (11) Garfin.

**النتائج والمناقشة**

**1- تحضير المستخلص الخام للكتين جنين الحنطة**

بسبب ارتفاع محتوى جنين الحنطة من الـدهون التـي بلغت 9.77% للعينات قيد الدراسة وبغية الحصول على WGA بنقاوة عالية تحتم إزالة الدهن أولا باستخلاصـه بالهبتان .إذ ان استخدام جنين الحنطة غير مزال الـدهن يؤدي إلى قلة كفاءة استخلاص البروتين ويؤدي وجـود الدهن إلى بطء سرعة الجريان في أعمـدة الفـصل (7) .وبسبب ثباتيـة WGA عنـد أسـس هيدروجينيـة منخفضة فقد تم استخلاص اللكتين من جنـين الحنطـة مزال الدهن باستخدام محلول حـامض الهيـدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار بدلا من الماء المقطر أو المحاليـل الدارئة. وبينت التجارب الأولية في هـذه الدراسـة ان المستخلص الخام يغلب عليه اللون البني ، وعليه أضيف Sodium dithionite بتركيز ملي مولار لمحلـول الاسـتخلاص الحامـضي لمنـع تفاعلات أكسدة الصبغات التي تتسبب فـي تغيـر لـون المستخلص إلى بني غامق وللحصول علـى مـستخلص يحتوي على مواد ملونة محدودة (7). ويوضح الجدول 1 ان الفعالية النوعية للكتين المستخلص من ثلاث وجبـات مختلفة تتراوح بـين 48.19 – 63.49 وحـدة /ملغـم وبمعدل مقداره 56 وحدة/ملغم. ولما كان مقـدار جنـين الحنطة المستخدم في كل وجبة هو500 غم من الجنـين مزال الدهن عليه فان غراما واحدا من جنـين الحنطـة يوفر كمية من اللكتين مقدارها 326.82 وحدة/ غم من جنين الحنطة ويعزى التباين في كمية اللكتين المستخلص من وجبة لأخرى إلى تأثير عوامل مختلفة لعـل أهمهـا خطوة إزالـة الـدهن مـن الجنـين لغـرض تهيئتـه للاستخلاص.

**جدول 1** . كمية وفعالية لكتين جنين الحنطة الخام المستخلص في ثلاث وجبات مختلفة

| الوجبة | الحجم (مل) | الفعالية (وحدة/مل) | البروتين (ملغم/مل) | الفعالية النوعية (وحدة/ملغم) | البروتين الكلي (ملغم) | الفعالية النوعية الاجمالية (وحدة) | كمية اللكتين (وحدة/غم جنين) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4125.00 | 40 | 0.83 | 48.19 | 3423.75 | 164990.51 | 329.98 |
| 2 | 4087.00 | 40 | 0.71 | 56.33 | 2901.77 | 163456.70 | 326.91 |
| 3 | 4045.00 | 40 | 0.63 | 63.49 | 2548.35 | 161794.74 | 323.58 |
| المعدل | 4085.66 | 40 | 0.72 | 56.00 | 2941.67 | 163413.98 | 326.82 |

لقد أشار Grant و آخرون (12)عند اسـتخلاص اللكتينات من مجموعة مـن النباتـات الاسـتوائية إلـى احتوائها على كمية ضئيلة مـن اللكتينات، ان لـم تكـن معدومة وذلك عنـد إجـراء الاسـتخلاص فـي أس هيدروجيني قاعدي، إلا ان إجراء الاستخلاص عند الأس الهيدروجيني 2.2 أدى إلى تحرر اللكتـين المـرتبط بالتركيب الخلوي ومن ثم زيادة ذائبيته.

## 2- تنقية لكتين جنين الحنطة

### ا- تركيز اللكتين

اخضع المستخلص الحامضي (الخام) لسلسلة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى منها بتركيز مستخلص اللكتين الخام بوساطة تقنية الترشيح الفائق Ultrafiltration للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وأمكن بهذه الخطوة إزالة نسبة كبيرة من المركبات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة التي تقل عن 10000 دالتون مع الراشح الخارج من خلية الترشيح الفائق. وأجريت عملية Diafiltration للانموذج المركز باستخدام محلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي الأس الهيدروجيني 8.5. وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية للكتين بلغت 5.71 مرة وبحصيلة مقدارها 98.34 % كما موضح في (الجدول 2).

### ب- كروماتوكرافيا التبادل الأيوني

يوضح الجدول 2 ان عدد مرات التنقية وحصيلة اللكتين للمحلول الناتج من خطوة كروماتوكرافيا التبادل الأيوني لجزء الغسل بلغت 7.5 مرة بحصيلة 80 %.

إن اقتصار الفعالية التلازنية على أجزاء الغسل فقط يؤكد عدم ارتباط اللكتين بالمبادل الأيوني السالب وان محصلة الشحنات المحمولة على اللكتين في الظروف المستخدمة هي شحنات موجبة أو قريبة من نقطة التعادل الكهربائي. وتتجلى أهمية هذه الخطوة في التخلص من الصبغات معظمها ونسبة كبيرة من البروتين عن طريق احتجازها بالمبادل ففي الأس الهيدروجيني 8.5 تدمص المركبات الملونة على مادة الفصل ولم تلاحظ فعالية تلازنية للبروتينات المرتبطة بالمبادل الأيوني بعد استردادها.

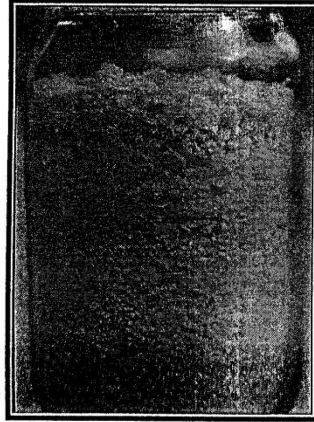
**جدول 2 .** خطوات تنقية لكتين جنين الحنطة

| خطوات التنقية | الحجم (مل) | الفعالية (وحدة/مل) | المعيار | البروتين (ملغم/مل) | الفعالية النوعية (وحدة/ملغم) | الفعالية الكلية (وحدة x $10^3$) | البروتين الكلي (ملغم) | عدد مرات التنقية | الحصيلة (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| المستخلص الحامضي | 4100 | 40 | 1:2 | 0.75 | 53.33 | 164 | 3075 | 1 | 100 |
| الترشيح الفائق | 252 | 640 | 1:32 | 2.10 | 304.76 | 161.28 | 529.2 | 5.71 | 98.34 |
| التبادل الايوني (الوجبة) | 410 | 320 | 1:16 | 0.80 | 400.00 | 131.20 | 328 | 7.5 | 80 |
| كروماتوكرافيا الألفة | 50 | 640 | 1:32 | 0.60 | 1066.60 | 32 | 30 | 20 | 19.51 |

### ج- تحضير الكايتين مختبريا

نظرا لتعذر الحصول على كمية كبيرة من الكايتين المحضر تجاريا فضلا عن غلاء ثمنه فقد جرى تحضيره مختبريا في هذه الدراسة ، إذ تم الحصول على الروبيان Shrimp من محافظة البصرة واستخدمت مخلفاته غير الصالحة للأكل (الهيكل الخارجي) مصدرا طبيعيا للحصول على الكايتين، وتمخضت عملية التحضير عن الحصول على ما يقارب من 40 غم كايتين أي ما يعادل 20 % كايتين من وزن القشور الجافة. ويبين الشكل 1 قشور الكايتين المحضر مختبريا في هذه الدراسة.تخذت خاصية الارتباط المتخصص للكتين جنين الحنطة بالسكر الأميني أساسا في خطوة تنقية ذلك اللكتين باستخدام كروماتوكرافيا الألفة. إذ استخدم الكايتين وهو متعدد حيوي Biopolemer ويوصف كيمياويا بأنه Poly – β -(1.4)-Nacetyl-D-Glucosamine ويعد ثاني اكبر معقد كيمياوي يصنع بشكل طبيعي على وجه البسيطة بعد السليلوز فهو مكون أساس لهياكل عدد كبير من اللافقاريات كالقشريات والحشرات والديدان الثعبانية وبعض المجاميع الفطرية (18 ،24).لقد استخدمت حبيبات الكايتين chitin beads في العديد من الدراسات لتنقية اللكتين من المستخلص الملحي لقرنات (الغلاف الخارجي) لنبات *Caesalpinia tinctoria* الذي ينتمي للعائلة البقولية (10) ولكتين *Araucaria angustifolia* المتخصص تجاه N-

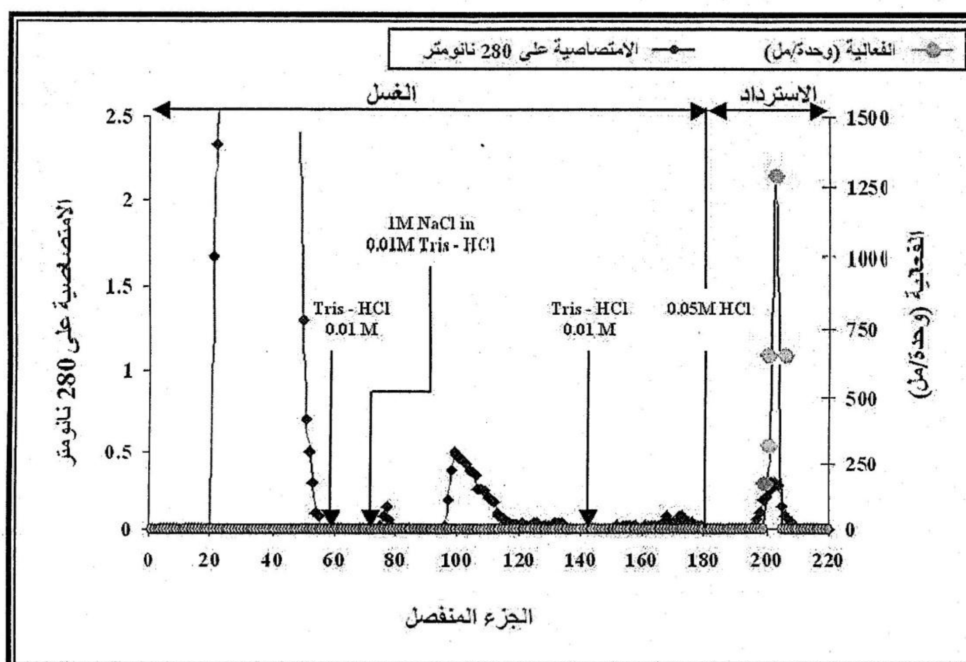
acetylglucosamine المعزول من بذور العائلة Araucariaceae (22) وبطريقة كروموتوكرافيا الألفة بعمود الكايتين.



**شكل 1.** قشور الكايتين المحضر مختبريا من مخلفات الروبيان

**د- التنقية بكروماتوكرافيا الألفة بعمود الكايتين**

يلاحظ من الشكل 2 ظهور قمة واحدة للفعالية التلازنية وذلك بعد استرداد اللكتين بمحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار، وعد ذلك أحد مؤشرات نقاوة اللكتين وبلغ عدد مرات التنقية اثر هذه الخطوة 20 مرة بحصيلة مقدارها 19.51% (الجدول 2).ان اعتماد الكايتين مادة لفصل للكتين بطريقة كروماتوكرافيا الألفة له جوانب إيجابية أخرى منها عدم الحاجة إلى تهيئة ذراع ligand للتوسط لربط اللكتين بالكايتين مع إمكانية إعادة استخدام الكايتين مرة ثانية بعد إعادة تنشيطه بخطوات بسيطة فضلا عن انها طريقة اقتصادية إلى حد بعيد لتوافر مصادر الاستخلاص الأساسية المتمثلة بالحيوانات البحرية كالروبيان وسرطان البحر Crab وجراد البحر Lobster في العراق وخصوصا في محافظة البصرة، ونظرا لكونها طريقة سريعة فانه يمكن اعتمادها لتنقية WGA على مستويات .يتضح مما تقدم ان استخلاص WGA وتنقيته بالخطوات المتبعة في هذه الدراسة تمتاز ببساطتها وسرعة إنجازها إذ انها تتطلب خطوة نبذ مركزي واحدة مقارنة مع طرائق التنقية الأخرى كما استبعدت طريقة المسخ الحراري للبروتينات الأخرى الملوثة المرافقة للكتين (17). وعند احتساب كمية اللكتين المستحصلة من كغم واحد من جنين الحنطة بعد الخطوة الأخيرة من التنقية وباتباع الخطوات المذكورة في هذه الدراسة وجد انها تعادل60 ملغم/1000غم من الجنين . نظرا لكون WGA هو أحد اللكتينات باهضة الثمن فقد تنافس الباحثون في إيجاد افضل الوسائل وانسبها لاستخلاصه وتنقيته سواء بطرائق التنقية التقليدية المتمثلة بكروماتوكرافيا التبادل الأيوني أو بوساطة كروماتوكرافيا الألفة باستخدام أعمدة الألفة المصنعة ovomucoid-sepharose (16) أو باستخدام العمود *p*-aminobenzyl-1-thio-β-D-Glucopyranoside-Sepharose 4B (20) ويذكر ان تصنيع أعمدة الألفة تلك، يعد عملية مكلفة ومعقدة في آن واحد. وحديثا ابتكرت أغشية الألفة بوصفها طريقة بديلة عن أعمدة الألفة وتتميز تلك الأغشية بقدرتها العالية على الارتباط بـ WGA إذ تتفوق على حبيبات الكايتين بما يقارب 20 مرة (21).

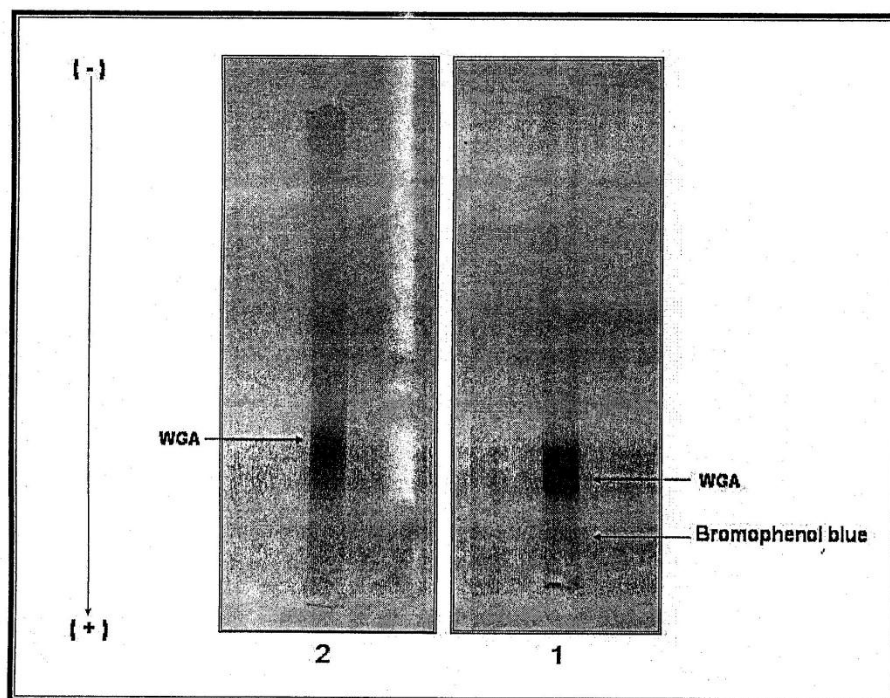



شكل 2. كروماتوكرافيا الالفة لتنقية لكتين جنين الحنطة بعمود الكايتين بابعاد (48×2.5 سم) الموازن بمحلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي أس هيدروجيني 8.5، غسل العمود بمحلول الموازنة ذاته تلاه محلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.01 مولار الحاوي على 1 مولار NaCl ذي أس هيدروجيني 8.5 ومن ثم محلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي أس هيدروجيني 8.5، جرى الاسترداد بمحلول HCl بتركيز 0.05 مولار وتمت عمليتا الغسل والاسترداد بسرعة جريان 300 مل / ساعة بواقع 10 مل للجزء.

**2- تعيين نقاوة اللكتين**

يوضح الشكل 3 نمط الترحيل الكهربائي لـ WGA المنقى بعد خطوة كروماتوكرافيا الآلفة وذلك في هلام الاكريلامايد المتعدد بتركيز 12% لهلام الفصل بوجود المواد الماسخة SDS-PAGE. إذ يلاحظ ظهور بروتين اللكتين على شكل حزمة واحدة مما يعطي صورة واضحة عن مدى كفاءة خطوات تنقية اللكتين التي استهدفت التخلص من البروتينات والأنزيمات والصبغات المرافقة له كافة في المستخلص الخام كما يدل على نقاوة اللكتين. ويلاحظ من الشكل تركز حزمة البروتين في الجزء السفلي من الهلام مما يشير إلى ان اللكتين ذو وزن جزيئي منخفض نوعا ما .كما يلاحظ من الشكل ان المسافة التي قطعها اللكتين بوجود المادة المختزلة 2-Mercaptoethanol اكبر مقارنة مع المسافة التي قطعها اللكتين بغياب المادة المختزلة مما يوحي بوجوده بأكثر من وحدة ثانوية واحدة تربطها أواصر ثنائية الكبريتيد S-S bond.

تعد تنقية اللكتينات ضرورة ملحة بهدف تعيين صفاتها الجزيئية ولإنجاز التطبيقات المختلفة وقد قام الباحثون بتنقية اللكتينات لغاية التجانس من مصادر نباتية مختلفة (9، 15) وقد ثبت أيضا انها كانت نقية بظهورها حزمة واحدة عند ترحيلها كهربائيا في هلام متعدد الاكريلامايد بظروف ماسخة وبوجود مادة مختزلة .




**شكل 3** . الترحيل الكهربائي للكتين جنين الحنطة المنقى على هلام الاكريلامايد المتعدد SDS-PAGE، إذ يمثل:
**1**. بوجود 2- Mercaptoethanol **2**. بغياب 2-Mercaptoethanol

**المصادر**


1.الجلاخ ،علاء هاني حسن . 2000 . عزل وتشخيص الأحياء المجهرية المحللة للكايتين في التربة ودراسة قابليتها على تحليل جدران بعض الفطريات. رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة بابل. ع ص 40 .

2.العاني ، زينب نوري . 2006 . استخلاص وتنقية جزئية للكتينات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية. أطروحة دكتوراه ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية. ع ص 75 .

3. علي، نورية عبد الحسين والدوري، سندس حميد والباقر، علاء يحيى. 2001 . غربلة بذور بعض النباتات المحلية لتحديد محتوى اللكتينات فيها. مجلة أبحاث التقانة الحيوية.3 (1) : 66-76.

4. Agah, A.; M. C. Montalto ; K. Young and G. L. Stahl. 2001. Isolation, cloning, functional characterization of porcine mannose-binding lectin. Immunology. 102: 338-343.

5. Alpuche, J.; A. Pereyra ; C. Agundis ; C. Rosas ; C. Pascual ; M. Slomianny ; L. Vazquez and E. Zenteno. 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (*Crustacea decapoda*) hemolymph. Biochimica et Biophysica Acta. 1724(1-2): 86-93.

6.Bies, C.; C. Lehr and J. F. Woodley. 2004. Lectin-mediated drug targeting : history and applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 56: 425-435.

7.Bouchard, P.; Y. Moroux ; R. Tixier; J. Privat and M. Monsigny. 1976. An

inner shoots of the edible chive (*Allium tubersum*). Journal of Protein Chemistry. 20(5): 361-366.

16. LeVine, D.; M. J. Kaplan and P. J. Greenaway. 1972 . The purification and characterization of wheat- germ agglutinin. Biochem. J. 129: 847-856.

17. Nagata, Y. and M. M. Burger. 1972. Wheat germ agglutinin isolation and characterization. 247(7): 2248-2250.

18. No, H. K.; S. P. Meyers ; W. Prinyawiwatkul and Z. Xu. 2007. Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. J. Food Sci.72(5):87-100.

19. Peumans, W. J. and E. J. M. Van Damme. 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol. 109: 347-352.

20. Rafestin, M. E.; A. Obrenovitch; A. Oblin and M. Monsigny. 1974. Purification of N-acetyl-D-glucosamine-binding protein by affinity chromatography. FEBS Lett. 40: 62.

21. Ruckenstein, E. and X. Zeng .2001. Purification of wheat germ agglutinin using macroporous or microporous filtration membrane. United state patent . January 16, 174, 443.

22. Santi-Gadelha, T.; C. A. A. Gadelha ; K. S. Agarao ; C. C. de Oliverira; M. R. L. Mota ; R. C. Gomes ; A. F. P. Pires ; M. H. Toyama ; D. Toyama ; N. M. N. de Alencar ; D. N. Criddle ; A. M. S. Assreug and B. S. Cavada. 2006. Purification and biological effect of *Araucaria angustifolia* (Araucaiaceae) seed lectin. Biochem. Biophys Research Commun. 3(50): 1050-1055.

23. Sato, Y.; M. Murakami; K. Miyazama. 2000. Purification and characterization of anoval lectins. Comp. Biochem. Physiol-B. Biochem. Mol. Biol., 125(2): 169-177.

improved method for purification of wheat germ agglutinin (lectin) by affinity chromatography. Biochimie. 58: 1247-1253.

8.Bradford, M. M. 1976 . A rapid and sensitive methodes for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

9.Da Silva, A. L. C.; C. G. Horta and R. D. A. Morerira. 2001 . Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. steua. 13 (3): 262-269.

10. De Oliveira, M. L.; L. M. Beltramini ; S. G. desimone ; M. H. N. Brumano ; R. A. Silva-Lucca ; M. K. K. Nakaema ; C.V. Pires and M. G. A. Oliveira. 2003. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. Braz. J. Plant Physiol. 15(2): 119-122.

11. Garfin, D. E. 1990. Purfication procedures: Electrophoretic Method. In E. D. Murray and P. Dentscher (ed.) . Method in Enzymology. John Wiley and Sons, Inc., N.Y., USA, Vol. 182 . pp. 425-441.

12. Grant, G.; L. J. More; N. H. Mc Kenzie ; P. M. Dorward, J. C. Stewart ; L. Telek, and A. Pusztai. 1991. A Survey of the nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. Livestock Research for Rural Development. 3 (3):55

13. Hossain, M. A.; S. M. Rafiqul Islam and Absar. 2004. Purification and characterization of lectin from mulberry seed (*Morus alba* L.). Pakistan J . Biol. Sci. 7 (10): 1808-1813.

14. Kakiuchi, M.; N. Okino ; N. Sueyoshilchinose, S. ; A. Omori ; S. Kawabata ; K. Yamaguchi and M. Ito. 2002. Purification ,characterization, and cDNA cloning of - N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera.* Glycobiol. 12(2): 85-94.

15. Lam, Y. W. and T. B. Ng. 2001 . A monomeric mannose – Binding lectin from

24. Shahidi, F.; J. K. V. Arachchi and Y. Jeon .1999. Food applications of chitin and chitisans. Trends in Food and Tech. 10: 37-51.

25. Sharon, N. 2007. Lectins: Carbohydrate – specific reagent and biological recognition molecules. J. Biol. Chem. 282(5): 2753-2764.

26. Sharon, N. and H. Lis. 2004 . History of lectins: from hemagglutinations to biological recognition molecules. Glycobiol. 14(11): 53-62.

27. Tateno, H.; H. C. Winter; J. Petryniak and I. J. Goldstein. 2003. Purification, characterization, molecular cloning and exepression of novel members of jacalin-related lectin from risomes of the true fern *Phlebodium aureum* (L) J. Smith (*Polypodiaceae*). The J. Biol. Chem. 278(13): 10891-10899.

28. Tronchin, G.; K. Esnault ; M. Sanchez ; G. Larcher ; A. Marot-Leblond and J. Bouchara .2002. Purification and partial characterization of a 32-Kilodalton sialic acid –specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. Infection and Immunity. 70(12): 6891-6859.

29. Zeng, X. and E. Ruckenstein. 1999 . Macroporous chitin affinity membrane for wheat germ agglutinin purification from wheat germ.. J. Membrane Sci. 156: 97-107.